

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Pavla Dohnalová

Diferenciace v okruhu *Galium palustre* ve střední Evropě
Differentiation in the *Galium palustre* group in central Europe

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Zdeněk Kaplan, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 6. 2020

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především mému školiteli Zdeňku Kaplanovi za jeho užitečné rady, připomínky a trpělivost a za to, že mě vždy vedl správným směrem. Velký dík také patří mé rodině, která mě podporovala během celého studia a taktéž všem mým přátelům za to, že mi pomohli překonat těžká období.

Abstrakt:

Cílem práce je shrnout doposud známé poznatky o skupině *Galium palustre* ve střední Evropě. Jedná se o polyploidní komplex, v jehož evoluci se uplatňovaly procesy polyploidizace a hybridizace. Jednotlivé cytotypy se liší v kvantitativních znacích i v ekologii a vykazují značnou morfologickou variabilitu. Z tohoto důvodu je taxonomie skupiny nejasná a názory na pojetí druhů se liší. V České republice se v rámci této skupiny vyskytují dva druhy, a to diploidní *Galium palustre* a oktoploidní *Galium elongatum*. Přesné údaje o jejich rozšíření a morfologické variabilitě nejsou známy, a proto bude na tuto teoretickou práci navazovat magisterská práce, kde budou použity modernější metody k objasnění problematiky.

Klíčová slova: polyploidizace, hybridizace, *Galium palustre*, *Galium elongatum*, morfologická variabilita

Abstract:

The aim of this work is to summarize the current knowledge about the *Galium palustre* complex in Central Europe. It is a polyploid complex, which has involved polyploidization and hybridization in its evolution. Individual cytotypes somewhat differ in quantitative characters and in ecology and show considerable morphological variation. For this reason, the taxonomy of the group is unclear and the opinions on the cytotype classification differ. There are two species in the *Galium palustre* complex distinguished in the Czech Republic, the diploid *Galium palustre* and the octoploid *Galium elongatum*. Exact data regarding their distribution and morphological variation are not known and therefore this thesis will be followed by a master's thesis, where modern methods will be used to clarify the issue.

Key words: polyploidization, hybridization, *Galium palustre*, *Galium elongatum* morphological variation

Obsah

1. Úvod	1
2. Charakteristika rodu <i>Galium</i> L.....	1
2.1. Morfologie.....	1
2.2. Vnitřní členění rodu	2
2.2.1. Popis sekce <i>Aparinoides</i>	2
2.2.2. Zástupci sekce <i>Aparinoides</i>	2
3. Charakteristika okruhu <i>Galium palustre</i>	3
3.1. Karyologie	3
3.2. Původ jednotlivých cytotypů.....	4
3.3. Taxonomie.....	4
3.4. Rozšíření.....	5
3.5. Morfologie.....	6
3.5.1. Lodyha.....	6
3.5.2. Listy.....	8
3.5.3. Květenství.....	10
3.5.4. Pylová zrna a plody	10
3.6. Ekologie	11
4. Mikroevoluční procesy.....	14
4.1. Speciace.....	14
4.2. Polyploidizace	15
4.3. Hybridizace	17
5. Navazující diplomová práce.....	18

5.1. Cíle	18
5.2. Metodika.....	19
5.2.1. Morfometrická analýza	19
5.2.2. Průtoková cytometrie	20
5.2.3. Molekulární metody	21
5.2.3.1. Sekvenace DNA	21
5.2.3.2. Dominantní molekulární markery	22
5.2.3.3. Mikrosatelity	22
5.3. Výsledky předběžných analýz.....	22
6. Závěr.....	24
7. Použitá literatura	25
8. Přílohy.....	29

1. Úvod

Skupina *Galium palustre* není na území České republiky dosud dostatečně známa. Patří do sekce *Aparinoides*, kde jsou časté polyploidní komplexy vzniklé v důsledku polyploidizace a hybridizace (Puff 1976, Puff 1977). Tím vzniklo mnoho cytotypů, které od sebe nelze vždy snadno rozeznat, především kvůli velké míře morfologické variability (Kliphuis 1974). Proto je taxonomie této skupiny velmi problematická a pohled na ní se stále vyvíjí. Předmětem zkoumání je hlavně míra morfologické plasticity a také odlišná ekologie cytotypů. Cílem mé bakalářské práce je literární rešerše dostupné literatury věnované tomuto problému.

Na bakalářskou práci bude navazovat diplomová práce. Předmětem jejího zájmu budou dva druhy vyskytující se na našem území, a to *G. palustre* a *G. elongatum*. Jednotlivé rostliny budou nejdříve odlišeny pomocí průtokové cytometrie. Následná morfometrická analýza pak určí, jak se od sebe rozlišené skupiny liší. Nastíním také možné molekulární analýzy, které by mohly objasnit danou problematiku.

2. Charakteristika rodu *Galium* L.

Galium náleží do čeledi Rubiaceae. Jedná se o velmi početný rod, který se vyskytuje na všech světadílech (Ehrendorfer et al. 1976). Počet uváděných druhů se liší od 400 (Ortega Olivencia and Devesa 2007) po více než 600 druhů (Chen and Ehrendorfer 2011, Yang et al. 2018). Největší druhovou diverzitu najdeme v Evropě (145 druhů) a v Turecku (101 druhů) (Mabberley 2008). Rod *Galium* není monofyletickou skupinou, stejně jako většina sekcí v rámci tohoto rodu (Yang et al. 2018). *Galium* náleží do tribu Rubieae, jehož výrazným rysem je vývoj listů v 4četných nebo vícečetných přeslenech. *Galium* zde tvoří nejpočetnější rod, přičemž ho následuje rod *Asperula* (Ehrendorfer et al. 2018).

2.1. Morfologie

Rostliny rodu *Galium* jsou jednoleté až vytrvalé byliny. Mají bohatě větvené tenké kořeny a oddenky. Lodyhy rostlin jsou přímé až vystoupavé, bývají často větvené, někdy se sterilními přízemními prýty. Listy jsou přisedlé, mezi nimi jsou palisty, které jsou tvarem i velikostí od listů nerozlišitelné, často bývají pomnožené a spolu s listy jsou uspořádané v 4–12četných přeslenech. Květy jsou uspořádané v chudokvětých vrcholících skládajících úžlabní

nebo terminální laty či vidlany, které jsou často bohatě větvené. Listeny v horní části květenství jsou drobné, úzce eliptické a jsou kratší než květní stopky. Květní stopky jsou delší než semeníky a nenajdeme zde žádné listence. Květy jsou oboupohlavné, pouze někdy jsou postranní květy vrcholíku jednopohlavné. Kalich v květu chybí nebo je silně redukovaný, koruna je nejčastěji 4četná, může ale být i 3četná nebo 5četná, a má kolovitý nebo nálevkovitý tvar. Barva koruny je bílá, nazelenalá nebo žlutá, korunní trubka je zřetelná, dlouhá maximálně jako korunní cípy, cípy jsou ploché nebo miskovitě prohnuté. V květu jsou 2 čnělky, srostlé nanejvýš do 2/3, blizna je kulovitá. Květy jsou opylovány entomogamně, může docházet i k autogamii. Plodem je dvounažka, která se za zralosti rozpadá na 2 merikarpia se suchým perikarpem, někdy pokrytým háčkovitými chlupy. Plod se pak šíří především pomocí zoochorie (Štěpánková 2000, Ehrendorfer et al. 1976).

2.2. Vnitřní členění rodu

Rod *Galium* je členěn do množství sekcí. Rostliny rostoucí u nás jsou rozdělovány do osmi sekcí. Jsou to *Platygaliun*, *Hylaea*, *Trachygaliun*, *Aparinoides*, *Galium*, *Leiogaliun*, *Leptogaliun* a *Kolgyda*. Okruh *Galium palustre* náleží do sekce *Aparinoides* (Štěpánková 2000).

2.2.1. Popis sekce *Aparinoides*

Druhy řazené do této sekce jsou vytrvalé byliny se štíhlými plazivými oddenky. Lodyhy jsou čtyřhranné, obvykle mívají drobné, nazpět obrácené ostré papily. Listy s palisty tvoří 4–6četné přesleny, mají pouze jednu hlavní žilku a vrchol je zaokrouhlený až špičatý. Usušené listy jsou většinou načernalé. Květenství rostlin je válcovitého až široce jehlanovitého tvaru. Dílčí květenství je cymózní. Koruna je 3–4četná, kolovitá, má bílou, růžovou nebo nazelenalou barvu. Merikarpia jsou kulovitá, hladká a lysá (Ehrendorfer et al. 1976, Štěpánková 2000).

2.2.2. Zástupci sekce *Aparinoides*

Kromě okruhu *G. palustre* najdeme v této sekci ještě další skupiny, například okruh *G. trifidum*, *G. obtusum* nebo *G. antarticum* (Puff 1976). Taxonomie a přesné vymezení druhů uvnitř těchto skupin je také předmětem diskuze. Ze sekce *Aparinoides* se v Evropě setkáme s následujícími druhy: *G. palustre*, *G. elongatum*, *G. debile* a *G. trifidum* (Ehrendorfer et al. 1976).

Jedinou skupinou sekce kromě okruhu *G. palustre*, která se vyskytuje v Evropě, je skupina *G. trifidum*. Jedná se o největší a nejsložitější skupinu sekce. Sestává se z 9 taxonů, které najdeme

téměř po celém světě, nicméně centrum diverzity má v Severní Americe. Jediným zástupcem, který se vyskytuje v Evropě, je *G. trifidum* subsp. *trifidum* (Puff 1976).

3. Charakteristika okruhu *Galium palustre*

Do skupiny *Galium palustre* řadíme druhy *G. palustre* (svízel bahenní), *G. elongatum* (svízel prodloužený) a *G. debile* (Teppner et al. 1976, Štěpánková 2000).

3.1. Karyologie

Galium palustre agg. je polyploidním komplexem. Zahrnuje diploidní, tetraploidní, oktoploidní a dodekaploidní rostliny, viz tabulka č. 1.

cytotyp	počet chromozomů	původ vzorků	zdroj
diploid (<i>G. palustre</i>)	$2n = 24$	Anglie, Švédsko, Česko, Německo	Hancock 1942, Apelgren and Lernstål 1991, Kliphuis 1974
tetraploid	$2n = 48$	Anglie, Balkán, Portugalsko, Španělsko	Hancock 1942, Kliphuis 1986, Kliphuis 1974, Kliphuis 1983
Oktoploid (<i>G. elongatum</i>)	$2n = 96$	Balkán, Španělsko, Anglie, Švédsko, Česko, Slovinsko	Kliphuis 1986, Kliphuis 1983, Hancock 1942, Alpelgren and Lernstål 1991, Kliphuis 1974, Frajman 2010
dodekaploid	$2n = 144$	Rakousko, Turecko	Teppner et al. 1976
diploid (<i>G. debile</i>)	$2n = 24$	Anglie, Španělsko,	Hancock 1942, Kliphuis 1983

Tabulka č. 1. Chromozomové počty a původ zjištěných cytotypů

Jména jsou doplněna pouze u cytotypů, u kterých panuje většinová shoda na taxonomické příslušnosti, taxonomie zbývajících cytotypů je nejasná.

Nejběžněji se vyskytují diploidy a oktoploidy (Teppner et al. 1976, Kliphuis et al. 1986). Dodekaploidní cytotyp je jeden z nejvyšších polyploidů v rámci rodu, vyšší ploidní úroveň mají pouze nepříbuzné *G. cliftonsmithii* (16–18x) a *G. grande* (20x) (Teppner et al. 1976).

Základním chromozomovým číslem okruhu je $x = 12$, přestože většina rostlin z rodu *Galium* má $x = 11$ (Teppner et al. 1976). Chromozomy jsou velmi malé, obvykle mají mezi 1–2 μm na délku a 0,3–0,4 μm v průměru (Hancock 1942). Průměrná velikost chromozomů je v rámci stejných cytotypů víceméně stálá (Teppner et al. 1976).

Kliphuis (1974) se pokoušel objasnit vzájemné vztahy mezi cytotypy a proto prováděl experimenty s jejich křížením. Křížení mezi stejnými cytotypy se dařilo bez problémů, po opylení se vždy vyvíjely plody. Naopak z křížení rozdílných cytotypů nikdy nevznikly žádné kříženci. Taktéž Apeltrenovy a Lernstálovy (1991) pokusy o křížení skončily neúspěchem.

3.2. Původ jednotlivých cytotypů

Názory na původ jednotlivých cytotypů z okruhu *G. palustre* se liší. Teppner et al. (1976) spojoval diploidní a tetraploidní rostliny do jednoho druhu (*G. palustre*), a tetraploidům přisuzoval autopolyploidní původ. O oktoploidech se naopak domníval, že jsou alopolyploidního původu, přičemž jejich předci jsou diploidní *G. palustre* a *G. debile*. Jiný názor zazněl od Kliphuise et al. (1986), který považoval za pravděpodobnější, že tetraploidy mají alopolyploidní původ a jedním z jejich možných předků by mohlo být *G. debile*.

3.3. Taxonomie

Taxonomické pojetí jednotlivých cytotypů v rámci *G. palustre* agg. dosud není vyřešeno. Situaci komplikuje především existence tetraploidů. Ve velkém množství znaků zaujímají intermediární postavení mezi diploidy a oktoploidy, a proto je jejich zařazení nejasné (Kliphuis 1974).

Kliphuis (1974) se domnívá, že by se mělo na všechny tři ploidie nahlížet jako na taxony stejné úrovně, s tím, že nejvhodnějším rankem zřejmě bude poddruh; diploidy označuje jménem *G. palustre* subsp. *palustre*, tetraploidy subsp. *tetraploideum* a oktoploidy subsp. *elongatum*. Teppner et al. (1976) naopak v rámci svého výzkumu nezjistil žádné podstatné odlišnosti mezi diploidy a tetraploidy, a proto je navrhnul zahrnout do jednoho druhu, *G. palustre*. Oktoploidy ale shledal snadno odlišitelnými, a proto by podle něj měly být samostatným druhem, *G. elongatum*. Apeltren a Lernstál (1991) považují za nejlepší řešení

rozdělit diploidy a oktoploidy do samostatných druhů, protože i navzdory velké fenotypové plasticitě jsou rozdíly mezi nimi značné. Pro diploidní taxon navrhuji jméno *G. palustre* s. str. a pro oktoploidní taxon *G. elongatum*. Většina autorů se shoduje, že k vyřešení tohoto taxonomického problému je třeba dalšího důkladného výzkumu.

Ani v případě *G. debile* není situace jasná. Rouy (1911) na něj pohlížel jako na poddruh *G. palustre*. Většina autorů jej však považuje za samostatný druh (Teppner et al. 1976, Kliphuis et al. 1986). Problémem se zabýval také Hancock (1942) který je rovněž přesvědčen, že se jedná o oddělený druh, zejména kvůli odlišné morfologii a ekologii.

3.4. Rozšíření

Rostliny z okruhu *Galium palustre* se vyskytují po celé Evropě, v severní Africe, západní Asii, dále na východ až k jezeru Bajkal, a také ve východní části Severní Ameriky, viz příloha 1 a 2 (Teppner et al. 1976, Kliphuis 1983).

Areály *G. palustre* a *G. elongatum* se překrývají, nicméně lze nalézt jisté rozdíly v rozšíření. V Evropě má diploidní *G. palustre* spíše severnější areál, chybí jen v nejjižnějších částech Pyrenejského, Apeninského a Balkánského poloostrova. V Severní Americe jsou rozšířeny na severovýchodě USA. V jižní Americe (Buenos Aires) se vyskytují pouze synantropně, tedy v důsledků lidské činnosti. Oktoploidy potom nalezneme v Evropě především v její jižní části, na východ zasahují po jihozápadní Finsko, Polsko, Ukrajinu a do Malé Asie, na jih až do severní Afriky. V USA je nalezneme především v SV části (Štěpánková 2000). Teppner et al. (1976) popisuje areály rozšíření *G. palustre* jako temperátně-boreální a *G. elongatum* jako temperátně-mediteránní.

Tetraploidy už jsou v Evropě méně časté. Nejdříve byly nalezeny ve Velké Británii a Portugalsku, poté i na Balkánském poloostrově a ve Španělsku (Hancock 1942, Teppner et al. 1976, Kliphuis 1983). Na velkém množství lokalit ve Španělsku dokonce tvořily dominantní cytotyp. Jejich areál je popisován jako sub-mediteránně atlantský (Kliphuis 1983). Dodekaploidní rostliny jsou extrémně vzácné; dosud byly nalezeny pouze na dvou lokalitách v Rakousku a Turecku (Teppner et al. 1976). *Galium debile* se běžně vyskytuje v jižní a jihozápadní Evropě, ale nalezeno bylo také v Anglii poblíž Oxfordu (Hancock 1942, Kliphuis 1983). Teppner et al. (1976) uvádí areál rozšíření *G. debile* jako mediteránně-atlantský.

Na území České republiky se *G. palustre* vyskytuje roztroušeně až hojně. Těžiště rozšíření má v mezofytiku a nižších polohách oreofytika. V termofytiku se nachází v územích

s častým výskytem vlhkých biotopů. Roste od planárního až do montánního stupně, vzácně i výše (Štěpánková 2000).

Galium elongatum se na našem území vyskytuje roztroušeně v termofytiku a mezofytiku, v oreofytiku pak jen vzácně. Nejhojněji je rozšířen v lužních polohách úvalových území, v pánvích a níže položených oblastech (např. Polabí, Budějovická a Třeboňská pánev, Haná atd.). Nalezneme ho od planárního do submontánního stupně, vzácně i výše (Štěpánková 2000).

3. 5. Morfologie

Mezi jednotlivými ploidními úrovněmi nalezneme rozdíly v morfologii, rostliny ale vykazují velkou fenotypovou plasticitu, což ztěžuje jejich určování (Kliphuis 1974, Apelgren and Lernstål 1991). Z tohoto důvodu se údaje od různých autorů ne vždy shodují. Naměřené hodnoty znaků se často mírně liší podle zemí, ve kterých byla tato měření prováděna. V této kapitole se pokusím shrnout dosavadní poznatky o morfologii jednotlivých cytotypů a také výsledky pokusů, které zkoumaly jejich morfologickou plasticitu.

3.5.1. Lodyha

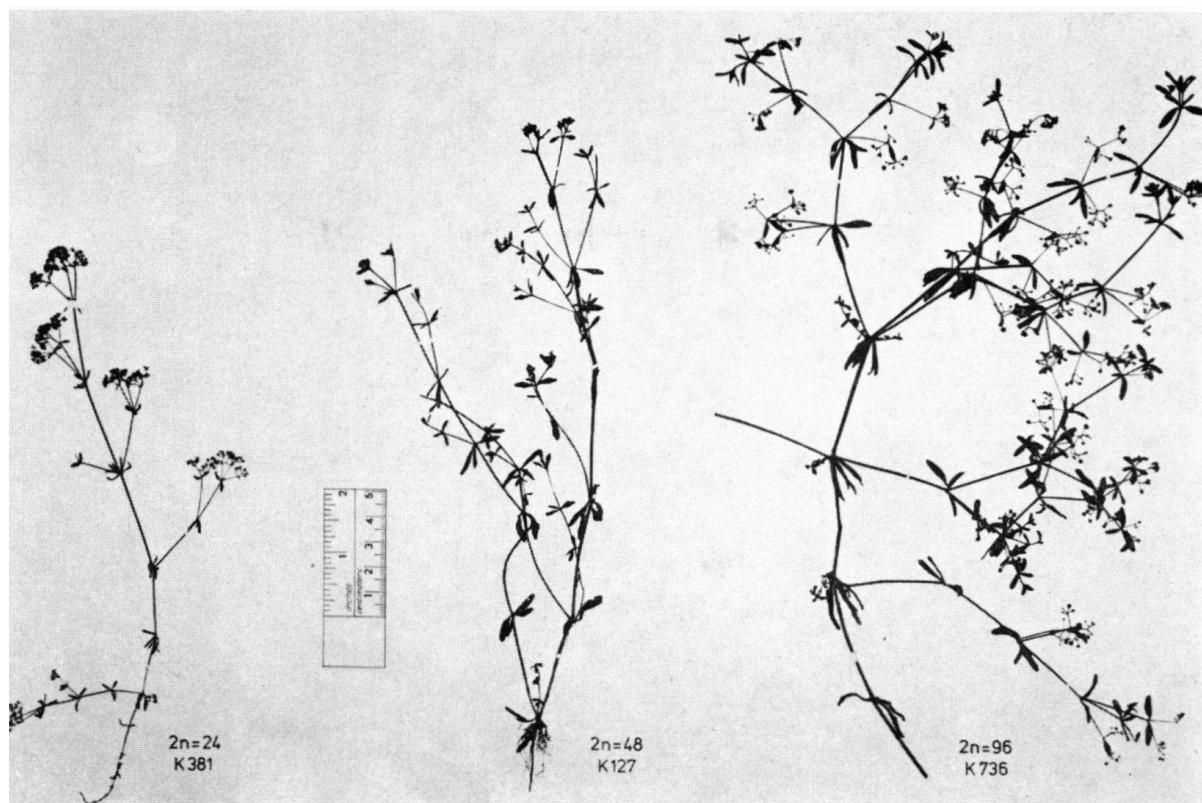
Galium palustre jsou vytrvalé byliny s tenkými, bohatě větvenými kořeny a oddenky, s četnými sterilními prýty, často plazivými a kořenujícími. Lodyha je chabá, poléhavá nebo vystoupavá, při bázi často kořenující, 20–60(–80) cm dlouhá, 0,5–0,8 mm široká, 4hranná s nevýraznými lištami na hranách, hladká, nebo jen mírně draslavá s drobnými ostrými nazpět obrácenými papilami, lysá (Štěpánková 2000).

Galium elongatum jsou vytrvalé byliny s tenkými, bohatě větvenými kořeny a krátkými oddenky, bez plazivých kořenujících sterilních prýtů. Lodyha je přímá nebo vystoupavá, (30–)50–100(–120) cm vysoká, 0,8–2,0 mm široká, 4hranná, křídlatá, křídla většinou nápadně světlá, hladká nebo jen mírně draslavá s nazpět obrácenými drobnými papilami (Štěpánková 2000).

Galium debile jsou vytrvalé byliny, jejich lodyha je víceméně přímá, dlouhá (10–)20–60(–80) cm. Internodia jsou poměrně dlouhá (Ehrendorfer et al. 1976, Kliphus 1983).

Tetraploidní rostliny jsou vzrůstem intermediární mezi drobnějšími diploidy a většími oktoploidy, viz obrázek č. 1. Zajímavým znakem, který napomůže od sebe rozeznat tetraploidy a oktoploidy, je vývoj lodyhy. Tetraploidy vytvářejí vzpřímené a pevné lodyhy, které nejsou

poléhavé, nebo pouze až ke konci sezony. Lodyhy oktoploidů se nejdříve vyvíjejí podobně, ale stanou se poléhavými mnohem dříve (Kliphuis 1974). Diploidy mají obecně užší lodyhu než oktoploidy. Tloušťka lodyhy je poměrně stálým znakem, nicméně byly zjištěny případy, kdy měly rostliny rostoucí na stinných lokalitách užší lodyhy než ty z osluněných stanovišť (Apelgren and Lernstål 1991).



Obrázek č. 1. Porovnání celkového vzhledu diploidních (vlevo), tetraploidních (uprostřed) a oktoploidních (vpravo) rostlin okruhu *Galium palustre* pěstovaných za stejných podmínek (Převzato z Kliphuis 1974)

Podrobněji zkoumána byla také drsnost lodyhy. Jak již bylo zmíněno výše, na povrchu lodyhy můžeme najít drobné papily, a zdá se, že jejich množství se u jednotlivých cytotypů liší. Apelgren a Lernstål (1991) ve svých pokusech zjistili, že lodyha diploidů je variabilní od zcela hladké až po velmi drsnou, zatímco lodyha oktoploidů je vždy drsná až velmi drsná. Také zjistili, že oktoploidy rostoucí na člověkem ovlivněných lokalitách mají tendenci mít drsnější lodyhu než diploidy, a rovněž že diploidy rostoucí na pobřežních lokalitách měly vždy lodyhu hladkou nebo téměř hladkou.

Délka internodií je velmi proměnlivá u všech cytotypů (Kliphuis 1974). Apelgrenův a Lernstålův experiment (1991) ukázal zajímavou skutečnost. U studovaných rostlin byl zjištěn

rozdíl v poměru výšky rostlin a délky jejich internodií, diploidní rostliny měly v průměru delší internodia, než by odpovídalo jejich výšce, než oktoploidy. Obecně je ale výška rostlin u všech cytotypů proměnlivá a je velmi závislá na okolním prostředí (Apelgren 1991).

3.5.2. Listy

Galium palustre má listy a palisty ve 4četných, někdy 5četných přeslenech, široce eliptického až eliptického tvaru, (16–)20–30(–40) mm dlouhé, (1,8–)2,5–3,0(–4,0) mm široké, zaokrouhlené nebo uťaté, lysé, i na okrajích hladké, trávově zelené, sušením černající.

Galium elongatum má všechny uvedené znaky obdobné, až na průměrnou velikost listů, která se uvádí jako (16–)20–30(–40) mm na délku, (1,8–)2,5–3,0(–4,0) mm na šířku (Štěpánková 2000).

Tetraploidy se opět nacházejí v pomyslném středu, mají obecně delší a širší listy než diploidy a zároveň kratší a užší než oktoploidní jedinci. Velikost listu je ale velmi proměnlivá a velký vliv zde mají vnější faktory, například světelné a vlhkostní podmínky nebo typ substrátu (Kliphuis 1974, Apelgren and Lernstål 1991). Plasticita je až tak velká, že se na tento znak nelze při rozeznávání cytotypů spoléhat. Snadno totiž může dojít k situaci, kdy se u diploidní rostliny rostoucí za příznivých podmínek vyvinou listy mnohem větší než u oktoploidní rostliny, čelící nepříznivým podmínkám (Kliphuis 1974).

Kliphuis (1974) se rozhodl zjistit, jak reagují jednotlivé cytotypy na odlišných typech půd. Pro experiment vybral 3 stanoviště, kam umístil naklonované rostliny. Prvním byla jílovitá půda, která bývá v létě suchá, v zimě naopak mokrá, druhým písčitá půda s příměsí jílu, vlhká a dobře propustná po celý rok, a posledním typem byla písčitá, velmi suchá půda. Obecně se nejlépe dařilo rostlinám na druhém, vlhkém typu půdy, nejméně potom na třetím, suchém typu. Výrazné rozdíly byly zjištěny právě ve velikosti listů. Diploidy měly vždy nejkratší a nejužší listy ze všech cytotypů, nezávisle na stanovišti. Tetraploidy měly většinou intermediární pozici, ne ale vždy. Na třetím suchém stanovišti dosáhly větší hodnoty v délce i šířce listů než oktoploidy, na prvním stanovišti zase měly téměř stejnou šířku listů jako oktoploidy, viz tabulka č. 2. Naměřené hodnoty také dokazují, že diploidní rostliny dokáží překonat ve velikosti listů oktoploidy, pokud k tomu mají vhodné podmínky.

Byl zde také zjištěn rozdíl ve tvaru listů. Diploidy měly na 1. a 3. stanovišti čárkovité až kopinaté listy, na druhém pouze kopinaté. Tetraploidy a oktoploidy tvořily na 1. stanovišti listy nejčastěji obkopinaté, někdy čárkovité, na 2. obkopinaté až úzce eliptické, na posledním potom pouze obkopinaté.

Z výsledků je tedy patrné, že plasticita tohoto znaku je značná a experiment potvrzuje skutečnost, že velikost listů ani jejich tvar není dobrým určovacím znakem (Kliphuis 1974).

Size of leaves in mm	I Polder				II Fort				III Baarn			
	\bar{X}	\pm SE	SD	N	\bar{X}	\pm SE	SD	N	\bar{X}	\pm SE	SD	N
length												
2n=24	8.20	0.07	1.64	500	10.85	0.10	2.04	400	5.19	0.06	1.24	400
48	11.25	0.16	2.92	350	14.26	0.20	2.48	150	9.11	0.24	2.92	150
96	12.35	0.11	2.42	500	17.15	0.18	3.39	350	7.30	0.08	1.56	400
width												
2n=24	1.12	0.02	0.36	500	1.96	0.03	0.62	400	0.93	0.01	0.24	400
48	1.94	0.03	0.29	350	2.47	0.06	0.77	150	1.73	0.03	0.38	150
96	1.89	0.02	0.52	500	2.67	0.04	0.68	350	1.20	0.02	0.37	400

Tabulka č. 2. Naměřené hodnoty délky a šířky listů (v mm) diploidních, tetraploidních a oktoploidních rostlin okruhu *G. palustre*, kultivovaných na odlišných typech půd (Převzato z Kliphuis 1974)

Hodnota X je průměr, SE vyjadřuje standartní chybu, SD směrodatnou odchylku, N je počet pozorování.

Galium debile má listy úzké, čárkovité, někdy špičatě zakončené a jsou uspořádané v 4–6četných přeslenech (Kliphuis 1983). Byla u něj pozorována neobvyklá vodní forma. Pokud má lodyhu ponořenou ve vodě, vytváří velmi dlouhé, úzké, vzdušné listy, které jsou 2–4× delší než obvykle, a liší se tak od *G. palustre*, jehož trvale ponořené listy jsou pouze o trochu menší a užší (Hancock 1942).

Častým úkazem v přírodě bývá jev, kdy mají rostliny rostoucí ve stínu větší plochu listů než jedinci rostoucí na osluněném stanovišti. Světelné podmínky ovlivňují také tloušťku listů. Listy, které jsou častěji vystavené slunečnímu záření, vytvářejí tenčí vrstvu palisádového parenchymu a jsou tedy celkově tenčí (Björkman and Holmgren 1963). Obě tyto tendence byly pozorovány i u *G. palustre*. Zkoumané rostliny vyskytující se na slunných pobřežních lokalitách měly podstatně menší listy (kratší i užší) než rostliny rostoucí ve stinných příkopech či močálech (Apelgren 1991).

Dobrým rozlišovacím znakem se zdá být velikost průduchů, rozdíly ve velikosti mezi diploidy a oktoploidy jsou signifikantní. Na základě svých pokusů zjistili Apelgren a Lernstål (1991) průměrnou velikost průduchů u diploidů 31,17 μ m a u oktoploidů 38,08 μ m a tyto hodnoty byly velmi podobné i u rostlin vyskytující se na různých stanovištích. Tetraploidy zde

opět zaujímají intermediární pozici mezi diploidy a oktoploidy, a ačkoliv je zde drobný překryv v hodnotách, naměřené průměrné velikosti prŮduchů mohou velmi pomoci s určováním rostlin (Kliphuis 1974).

3.5.3. Květenství

Galium palustre má terminální válcovité květenství, bohatě větvené, květní stopky jsou 2–3 mm dlouhé. Kolovitá koruna je bílá, 2,5–4,0 mm v průměru velká, je téměř až k bázi členěná v miskovitě prohnuté korunní cípy. Čnělky jsou srostlé jen na bázi.

Galium elongatum má terminální květenství, které je v obrysu široce vejčité, květní stopky jsou 2–4 mm dlouhé. Má kolovitou bílou korunu, (3,0–)4,0–5,3(–5,8) mm v průměru velkou, do 2/3 členěnou v miskovitě prohnuté korunní cípy. Čnělky jsou srostlé do 1/3 (Štěpánková 2000).

Zmíněnou velikost koruny potvrzuje i Kliphuisův (1974) experiment, při kterém byly měřeny hodnoty u rostlin, rostoucích na různých typech půd. Průměrná velikost koruny diploidů zde vyšla okolo 3,45 mm (rozpětí 3,18–3,85 mm), u tetraploidů 3,8 mm (3,57–3,95 mm) a u oktoploidů 4,18 mm (3,88–4,65 mm). I když zde byl mírný překryv hodnot tetraploidních rostlin s ostatními cytotypy, stále je velikost koruny považována za jeden z nejlepších rozlišovacích znaků mezi zmíněnými cytotypy a to hlavně z důvodu, že není téměř ovlivňována vnějšími faktory (Kliphuis 1974, Apeltgren and Lernstål 1991).

Bohatost květenství je silně ovlivňována světelnými podmínkami. Například rostliny rostoucí na nechráněných příbřežních stanovištích mívají bujnější květenství než rostliny na stinných lokalitách. Důvodem je zřejmě převedení zdrojů z generativních částí rostliny do vegetativních, čímž se rostlina snaží přerůst okolní vegetaci v konkurenci o světlo (Apeltgren a Lernstål 1991, Apeltgren 1991).

5.3.4. Pylová zrna a plody

Galium palustre má pylová zrna 17–18 µm dlouhá, 14–15 µm široká. Kulovitá merikarpia jsou dlouhá 1,4–1,6 mm v průměru, jsou černá, lesklá, na povrchu jemně zvrásněná.

Galium elongatum má pylová zrna 21–22 µm dlouhá, 17–18 µm široká. Merikarpia jsou v průměru 1,6–2,0 mm dlouhá (Štěpánková 2000).

Velikost plodu je velmi stálá, nemění se podle prostředí a je tedy dobrým rozlišovacím znakem (Kliphuis 1974). Poměr délky a šířky plodu je konstantní a neliší se ani mezi diploidy

a oktoploidy (Apelgren and Lernstål 1991). Obecně jsou tyto reprodukční znaky stálější, kdežto vegetativní znaky vykazují větší plasticitu (Bradshaw 1965).

3.6. Ekologie

Rostliny z okruhu *Galium palustre* jsou vytrvalé byliny, které se rozmnožují jak pohlavně, tak nepohlavně. Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí výběžků a na mnoha lokalitách lze najít populace rozrůstající se pouze klonálně (Apelgren 1991). Rostliny jsou cizosprašné (Apelgren and Lernstål 1991).

Všechny cytotypy vyhledávají vlhká místa. Diploidní a oktoploidní rostliny mají z velké části společný areál rozšíření, nicméně můžeme zde najít mírně odlišné ekologické preference. Terénní pozorování na lokalitách v Nizozemsku ukázalo, že diploidy rostou na vlhkých místech, které v létě vysychají, kdežto oktoploidy obývají permanentně zamokřené zóny, často hraničící s hladinou vody. Preference tetraploidů jsou potom jakýmsi přechodem mezi typem lokalit diploidů a oktoploidů (Hancock 1942, Kliphuis 1974).

Detailní pozorování abiotických faktorů stanoviště probíhalo na lokalitě v Odoornu, v již zmíněném Nizozemsku. V zimě je zde půda zaplavována do výšky 10–15 cm, na jaře voda opadne a přes léto je půda vysušená až do pozdního podzimu, jedná se tedy o ideální prostředí pro diploidy. Ekologická diferenciací byla pozorována také na lokalitě u Ijselského moře. Podél jeho hráze (cca 30 km) jsou některá místa trvale zaplavená, výše postavená pak v létě vysychají. Zde byly sebrány vzorky 5–7 rostlin z náhodně vybraných populací. Stanoviště skutečně odpovídala ekologickým preferencím jednotlivých cytotypů, tedy že diploidy byly na výše postavených místech, oktoploidy na nižších mokřejších místech (Kliphuis 1974).

Taktéž ve Švédsku byly zkoumány lokality jednotlivých cytotypů. Většina rostlin se vyskytovala v různých mokřinách, bažinách, močálech a vodních příkopech. Výraznější rozdíl ve výskytu byl zjištěn u mořského pobřeží, kde byly mnohem častěji nalézány diploidy. Obzvláště početné populace tvořily na chráněných loukách poblíž mořského pobřeží, dokonce na nich místy byly dominantním druhem. Diploidní rostliny převažovaly také v jehličnatých lesích, v zemědělských oblastech naopak oktoploidní. To by mohlo naznačovat, že diploidy se častěji vyskytují na půdách s menším množstvím živin (Apelgren and Lernstål 1991). Výsledek těchto pozorování by potvrzoval domněnku Ehrendorfera (1980), který tvrdí, že diploidům se více daří ve stabilním prostředí a v klimaxových společenstvech, kdežto odvozené polyploidní rostliny se lépe uchytí na disturbovaných či rudérálních lokalitách a na místech v rané fázi

sukcese. Tento jev je možné pozorovat například u diploidů a tetraploidů druhu *Dactylis glomerata* (Ehrendorfer 1980).

Na našem území nalezneme diploidy v okolí rašelinných a aluviálních luk, na bahnitých březích vodních nádrží, potoků a kanálů, také v okolí pramenišť a tůní nebo na obnažených rybníčních dnech. Rostliny se vyskytují na živiny bohatých, organických i minerálních půdách, vyhovuje jim slabě kyselé až slabě zásadité prostředí a vyžadují hlavně vysokou hladinu podzemní vody. Oktoploidy se vyskytují na bahnitých březích eutrofních stojatých vod a odvodňovacích kanálů a v mokřadech ve světlých lužních lesích. Preferují půdy bohaté na živiny (zejména na dusík), stejně jako diploidy vyhledávají slabě kyselé až slabě zásadité prostředí, často jsou na zbahnělých a humózních půdách (Štěpánková 2000).

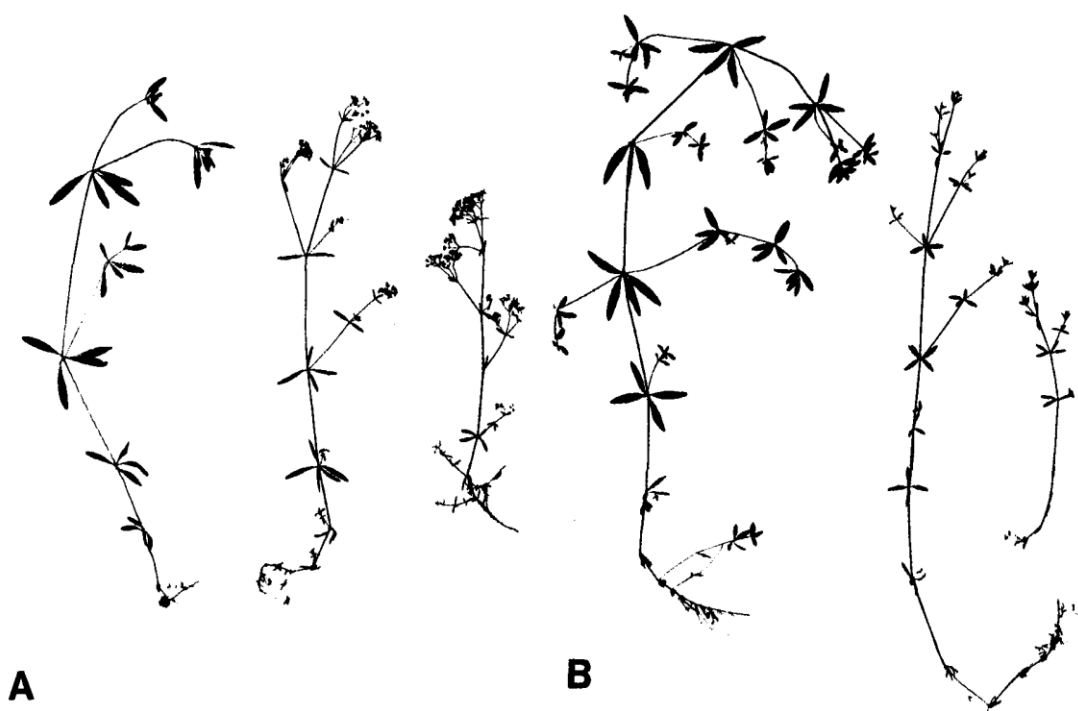
Tetraploidy byli podrobněji zkoumány na lokalitách v severozápadním Španělsku. Toto území je pod silným vlivem Atlantského oceánu, střídají se zde sušší období a období bohatá na dešťové srážky, následkem čehož se může zaplavovat půda v okolí říček a potoků. Na takovýchto lokalitách často nalezneme tetraploidy, které vyhledávají zamokřená místa poblíž potoků, nerostou však přímo ve vodě (Kliphuis 1983).

Galium debile roste na lokalitách, které jsou v zimě a na jaře trvale ponořené ve vodě. Nejčastěji je nalezneme v mělkých částech nejrůznějších vodních příkopů či jezírek. Pokud ale voda v létě vyschne, můžeme najít rostliny na suchém dně, snesou tedy i tyto extrémní výkyvy (Hancock 1942).

Výše zmíněné popisy lokalit sice odpovídají ekologickým preferencím jednotlivých cytotypů, nicméně jejich diferenciaci není úplná. Často lze nalézt oktoploidy v prostředí typickém pro diploidy a naopak (Apelgren and Lernstål 1991). V souvislosti s tímto tématem se Hancock (1942) domnívá, že oktoploidy jsou ve svých ekologických požadavcích tolerantnější než diploidy a že zvládají růst na místech, která jsou mnohem sušší, než je pro ně typické. Podobný názor sdílí Kliphuis et al. (1986), který považuje tetraploidy a oktoploidy za ekologicky tolerantnější a potvrzuje to i jeho shlukovací analýzy, kde vždy diploidy tvořily velmi dobře oddělitelné shluky.

Apelgren (1991) se ve svých pokusech snažil zjistit míru plasticity diploidních a oktoploidních rostlin. Vybral proto 3 odlišná prostředí, která měla otestovat reakci rostlin: slunečné příbřežní stanoviště, mokrý příkop a stinný močál s olšemi. Rostliny byly naklonovány a následně rozděleny na jednotlivá stanoviště, kde rostly 1 rok. Plastická odpověď

obou cytotypů byla téměř totožná: nejvíce se rostlinám dařilo v močálu s olšemi, nejméně naopak na exponovaném stanovišti, viz obrázek č. 2.



Obrázek č. 2. Plastická odpověď klonálně namnožených rostlin *Galium palustre* (A) a *Galium elongatum* (B) pěstovaných jeden rok ve stinném močálu s olšemi (vlevo), v mokřém příkopu (uprostřed) a na slunečném příbřežním stanovišti (vpravo) (převzato z Apelgren 1991)

Předmětem zkoumání byly také průvodní druhy, tedy rostliny, které můžeme nalézt v blízkosti těchto svízelů. Apelgren a Lernstål (1991) se pokoušeli zjistit, zda se liší zastoupení průvodních druhů u jednotlivých cytotypů. Složení druhů se samozřejmě velmi měnilo s prostředím. Obecně se poblíž oktoploidů vyskytovaly druhy vyhledávající vlhčí podmínky, jako například *Glyceria fluitans* či *Alisma plantago-aquatica*. Kliphuis (1974) pozoroval poblíž oktoploidů častý výskyt *Cardamine pratensis*, *Carex otrubae* nebo *Lysimachia nummularia*. Diploidy se vyskytovaly pospolu s rostlinami, které měly širší ekologickou niku. Byl pozorován výskyt vlhkomilnějších druhů jako jsou *Potentilla palustris* nebo *Carex rostrata*, ale také typicky suchomilného druhu *Festuca pratensis*. Mnoho druhů se ale vyskytovalo poblíž svízelů nezávisle na jejich cytotypu. Výsledkem pozorování tedy je, že jsou zde pouze mírné rozdíly mezi průvodními druhy a jejich výskyt je závislý na konkrétních podmínkách a lokalitě (Apelgren and Lernstål 1991). Na našem území se oba cytotypy často vyskytují ve

společenstvech svazů *Magnocaricion elatae*, *Phragmites communis* a *Alnion glutinosae* (Štěpánková 2000).

Rostliny kvetou převážně v červnu a červenci, s tím, že *G. elongatum* začíná kvést přibližně o 14 dní později než *G. palustre* (Štěpánková 2000). Kliphuis (1974) zkoumal dobu kvetení v experimentální zahradě. Výsledky ukázaly, že tetraploidní a oktoploidní rostliny začínají kvést přibližně ve stejný čas, diploidy nasadily květy o 10–14 dnů dříve. Kultivační experimenty prováděli také Apeltgren a Lernstål (1991), kteří ovšem zjistili, že rozdíl v počátku kvetení diploidů a oktoploidů je necelý týden. Pozorování v přírodě potvrdila již zmíněná dva týdny. Tyto experimenty tedy dokázaly, že odlišný začátek kvetení dvou cytotypů je podmíněný jak genetickými, tak environmentálními faktory. Na fakt, že diploidní rostliny začínají kvést dříve než odvozené polyploidní druhy, upozornil již Lewis (1976), který zkoumal fenologii cytotypů *Claytonia virginica*.

Apeltgren a Lernstål (1991) také zkoumali rychlost klíčení. Ačkoliv vyseli semena diploidních a oktoploidních rostlin ve stejný čas, diploidy začaly klíčit přibližně o týden dříve. Dále objevili mírnou tendenci pro dřívější rozkvet rostlin rostoucích v pobřežních lokalitách oproti těm ve vnitrozemí. Tento fenomén byl pozorován také u jiných rostlin, například u *Myosotis laxa*. Jedná se zřejmě o ekologickou adaptaci (Apeltgren and Lernstål 1991).

4. Mikroevoluční procesy

Mikroevoluce probíhá uvnitř druhu a zkoumá vznik a vývoj adaptivních znaků (Flegl 2007). Způsobuje změny v genové frekvenci populací, a proto se projeví již v řádu několika generací (Ridley 2004). Mezi nejvýznamnější mikroevoluční procesy, které ovlivnily evoluci okruhu *Galium palustre* patří polyploidizace a hybridizace. Důležitou roli hraje také speciace, která působí na pomezí mikroevoluce a makroevoluce. Makroevoluční procesy dávají vznik vyšším taxonům a působí ve větším časovém měřítku (Briggs and Walters 2001).

4.1 Speciace

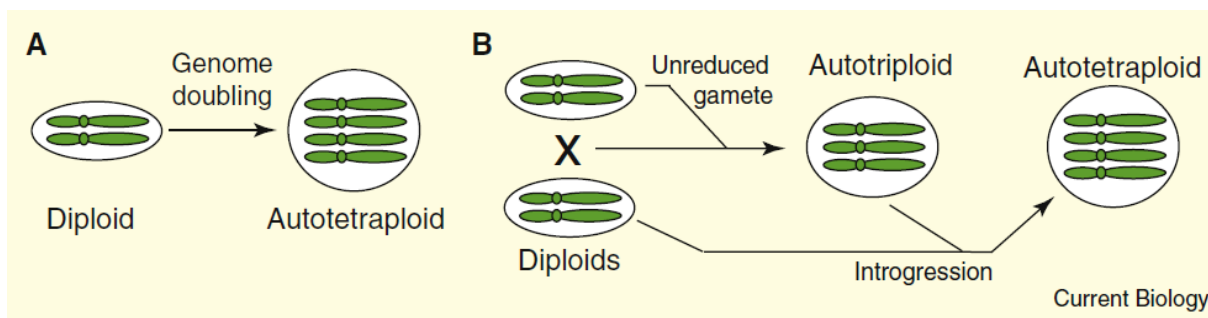
Z hlediska délky trvání se dá speciace rozdělit na dva typy, pozvolnou a saltační. U pozvolné speciace hraje roli mnoho procesů, jejichž vlivem se začnou hromadit malé změny, které vytvoří z původně volně křížící se populace nové druhy. Patří mezi ně náhodné procesy, jako jsou mutace, efekt zakladatele nebo efekt hrdla láhve, který posiluje vliv genetického

driftu. Podstatnou roli hraje selekce, při níž dochází ke genetickému rozrůznění vlivem působení odlišných faktorů, a také migrace, která ovlivňuje izolaci populací od genového toku. Při saltační speciaci jsou naopak změny rychlé a skokové. Může ji způsobit změna počtu chromozomů nebo jejich přestavba, nejčastější případem (následkem) je vznik polyploidie, s níž mnohdy úzce souvisí také hybridizace. Saltační speciace vede k sympatrickému vzniku druhů (Briggs and Walters 2001). Vznikají zde vnitřní reprodukční bariéry, přestože se nově vzniklé druhy formují na stejném území, které obývá mateřský druh. Opakem sympatrické je alopatriká speciace, při níž se část populace vyvíjí mimo kontakt s původním druhem, např. vlivem geografické izolovanosti (Flegr 2007).

4.2. Polyploidizace

Jako polyploidy se označují organismy s genomem, který obsahuje více než dvě sady chromozomů (Hegarty and Hiscock 2008). Polyploidizace je nepostradatelnou součástí evoluce krytosemenných rostlin a mnohým liniím umožnila prudce zvýšit svou diverzitu (Soltis et al. 2009). Názory na míru vlivu polyploidie na druhovou rozmanitost se ovšem liší, někteří vědci ji přisuzují pouze okrajovou roli, někteří jí naopak považují za hlavní faktor evoluce (Otto 2000). Již v dávné minulosti proběhly celogenomové duplikace (whole genome duplication, WGD) a předpokládá se, že procesem polyploidizace prošly zřejmě všechny krytosemenné rostliny (Soltis et al. 2009). Za výjimku byl považován rod *Amborella*, jež je bazálním rodem krytosemenných rostlin, nicméně novější studie naznačují, že i tato starobylá skupina v minulosti procesem polyploidizace prošla (Amborella Genome Project 2013).

Rozlišujeme dva základní typy polyploidizace, a to autopolyploidizaci a alopolyloidizaci. Při autopolyploidii dochází ke zdvojení chromozomové sady v rámci jednoho druhu. Při rozmnožování může dojít k narušení normálního průběhu mitózy, například pokud rostlina zažije tepelný šok nebo je vystavena působení alkaloidu kolchicinu, který je inhibítozem dělicího vřeténka. Potom nedojde ke vzniku dvou buněk s diploidním počtem chromozomů, ale pouze jedné buňky, která ale obsahuje čtyřnásobek haploidní chromozomové sady. Tato buňka se pak může podílet na tvorbě polyploidních semen. Dalším způsobem, jak mohou vzniknout autopolyploidní rostliny, je splynutím dvou neredukovaných gamet, viz obrázek č. 3 (Briggs and Walters 2001).



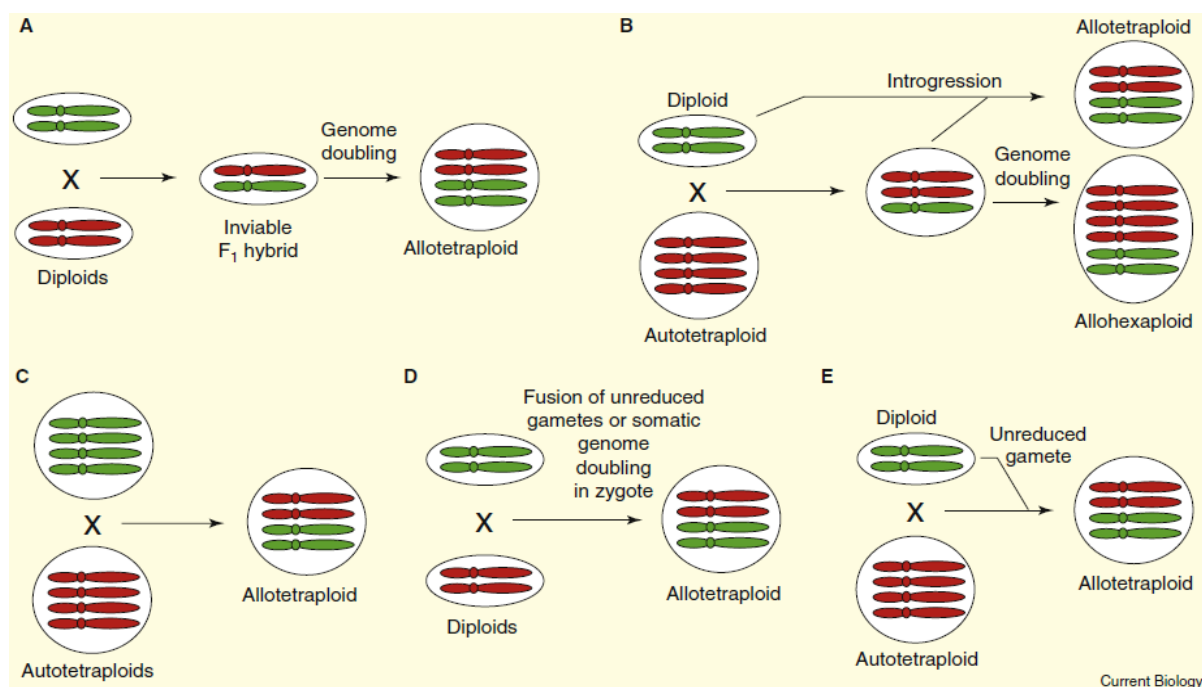
Obrázek č. 3. Autopolyploidie (převzato z Hegarty and Hiscock 2008).

- (A) Autopolyploid vzniklý spontánní genovou duplikací nebo splynutím neredukovaných ($2n$) gamet v rámci jednoho druhu
- (B) Splynutí neredukované ($2n$) gamety a normální redukované gamety v rámci jednoho druhu, což vede nejdříve k tvorbě autotriploida. Pokud může triploid produkovat fertilní triploidní vajíčka, po splynutí s redukovanou gametou může dát vznik tetraploidovi.

Alopolyploidizace naopak zahrnuje více druhů a předchází jí hybridizace, viz obrázek č. 4 (Briggs and Walters 2001). Pokud se zkříží dva druhy, jejichž stavba chromozomů je odlišná, bude jejich potomek pravděpodobně neplodný. Spontánní zmnožení chromozomů ale vyřeší problém s jejich párováním a vznikne tak plodný jedinec (Hegarty and Hiscock 2008). Odvození alopolyploidy jsou pak reprodukčně izolovaní od rodičovských druhů (Briggs and Walters 2001). K tomuto procesu zřejmě dochází snáze než k autopolyploidii a v přírodě se jedná se o častější jev (Flegr 2007, Hegarty and Hiscock 2008).

Pro vznik polyploidních druhů musejí být rodičovské druhy v těsné blízkosti (proto se jedná o druh sympatrické speciace) a díky skokovým změnám se nové druhy objevují v krátkém časovém období. Důležitou skutečností je, že polyploidy mohou vznikat opakovaně. Jestliže jsou jejich mateřské druhy v opakovaném kontaktu, pak je logické, že může být polyploidních událostí více a také mohou probíhat na různých místech. Opakovaný vznik polyploidie byl dokázán například u kříženců rodu *Tragopogon* (Briggs and Walters 2001).

Ve velkém množství rodů odpovídají počty chromozomů přesnému násobku jejich základního čísla. Někde najdeme zástupce druhů více ploidních úrovní, jinde zase máme rostliny s vysokým počtem chromozomů, přičemž jejich předci s nižším počtem již vyhynuli (Briggs and Walters 2001). Mezi rekordmany v počtu chromozomů patří *Sedum suaveolens* s $2n =$ kolem 640 (Uhl 1978) jako zástupce dvouděložných rostlin, mezi kapradinami pak najdeme *Ophioglossum reticulatum* s $2n = 1440$ (Khandelwal 1990).



Obrázek č. 4. Alopolyloidie (převzato z Hegarty and Hiscock 2008).

- A) Mezidruhovú hybridizace s neživotoschopným F₁ hybridem (z důvodu špatného párování chromozomů při meióze), následovaná zdvojením genomu za vzniku fertilního allotetraploida.
- B) Mezidruhovú hybridizace mezi dvěma druhy s různou ploidií; vznikne sterilní F₁ triploid, následuje duplikace genomu za vzniku životoschopného alohexaploida. Triploid se může také zpětně zkřížit s diploidními rodiči, čímž vznikne allotetraploidní potomstvo. K tomu může také dojít, když je počáteční triploid výsledkem fúze mezi jednou normální a jednou neredukovanou gametou stejného druhu, což vede ke vzniku allotetraploidů.
- C) Mezidruhovú hybridizace mezi dvěma tetraploidy za vzniku allotetraploidů. Vyšší ploidie dávají stejný výsledek, pokud je výsledný chromozomový komplement vyvážený.
- D) Splnutí dvou neredukovaných gamet od dvou rozdílných druhů za vzniku allotetraploida. Může vzniknout také somatickým zdvojením v hybridní zygotě.
- E) Mezidruhovú hybridizace zahrnující fúzi neredukované gamety diploida a normální redukované gamety tetraploida

Polyploidní rostliny jsou méně náchylné k homozygotnosti a inbrední depresi, kterou způsobuje samosprášení. Naopak ale mohou mít častěji problémy s meiózou a následnou sterilitou, přičemž je tento problém častější u jedinců s lichým počtem chromozomových sad (Briggs and Walters 2001).

4.3. Hybridizace

Hybridizace může být definována jako reprodukce mezi geneticky odlišnými populacemi, produkující potomstvo smíšeného původu. Místo, kde se jedinci setkávají a kříží se, se nazývá hybridní zóna (Barton and Hewitt 1985). Křížení mohou být jak vnitrodruhovú, tak mezidruhovú. Pokud se kříží druhy se stejnou ploidií, vznikne tzv. homoploid (Soltis and Soltis 2009).

Jak bylo již řečeno výše, hybridy mívají často sníženou fertilitu nebo jsou úplně sterilní kvůli špatnému párování chromozomů. Fertilitu lze ale obnovit zmnožením chromozomové sady, což následně vede ke vzniku alopolyloidů (Hegarty and Hiscock 2008). Hybridizace tedy může být příčinou okamžité speciace druhů, také ale může zpomalit nebo zastavit vývoj nových druhů tím, že umožní tok genů a rekombinaci mezi jedinci (Abbott et al. 2013).

Pokud jsou hybridy v selekční výhodě oproti rodičovským druhům, může dojít k procesu zvaném introgrese. Dochází k opakovanému zpětnému křížení hybridů s jedním či oběma rodiči, následkem čehož jsou geny jednoho druhu vneseny do druhého (Anderson 1953). Význam toho procesu je předmětem diskuze a není jasné, jak podstatnou úlohu hraje v evoluci.

Z důvodu snížené fertility potomků se rostliny snaží hybridizacím bránit, a to tvorbou reprodukčních bariér, které zabrání toku genů mezi druhy. Bariéry mohou být vnější (geografická či časová izolace) a vnitřní, které můžeme dále rozdělit na postzygotické a prezygotické. Prezygotické bariéry snižují pravděpodobnost vzniku hybridní zygoty, čehož lze dosáhnout například gametickou inkompabilitou nebo lákáním odlišných opylovačů. Postzygotické bariéry brání vývinu hybridu v dospělce, ale také tím často snižují fitness rodiče. Dochází k mortalitě zygot a také ke sterilitě a neživotoschopnosti hybridů (Flegr 2007).

K ověření hypotéz slouží různé hybridizační experimenty. Jejich výsledky je ovšem třeba brát s rezervou, protože se do pokusů často zahrne jen malý počet jedinců a podmínky vytvořené ve skleníku mohou výsledek podstatně ovlivnit. V uzavřeném prostoru se často přemnoží houby či hmyz a také rozdílná teplota uvnitř izolačního obalu může vést k pylové sterilitě. Vývoj chromatografie v šedesátých letech 20. století umožnil lépe zkoumat hybridizaci díky sledování sekundárních chemických sloučenin, jako jsou například alkaloidy či fenolické látky, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy (Briggs and Walters 2001).

5. Navazující diplomová práce

5.1. Cíle

V magisterské práci se budu zabývat okruhem *Galium palustre* především na území České republiky. Nyní jsou u nás odlišovány dva druhy, a to *G. palustre* a *G. elongatum*. Dosud však není dostatečně prozkoumán rozsah morfologické variability druhů, taktéž máme nedostatečné údaje o rozšíření na území České republiky a vazby rostlin na stanoviště.

Práce se bude zabývat následujícími tématy:

- Zhodnocení cytotypové variability okruhu
- Morfometrické zhodnocení variability zjištěných cytotypů
- Vymapování rozšíření druhů na území České republiky
- Zkoumání vazby zjištěných cytotypů na stanoviště

5.2. Metodika

Ve své magisterské práci použiji k řešení otázek následující metody:

5.2.1. Morfometrická analýza

Tato analýza umožňuje zhodnotit fenotypovou variabilitu u daných objektů a spočívá v měření kvalitativních a kvantitativních znaků. V rámci této metody máme dva odlišné přístupy. Prvním z nich je numerický přístup, také tradiční, který využívá měření vzdáleností mezi referenčními body. Při něm ovšem nelze zjistit přesný tvar organismu či orgánu. Proto vznikl druhý přístup, a to geometrický. Ten srovnává konfigurace význačných bodů (tzv. landmarks), jejichž poloha se zaznamenává pomocí souřadnicové sítě. Fenetické metody se dříve uplatňovaly na všech taxonomických úrovních, dnes slouží především k hodnocení vnitrodruhové nebo mezidruhové variability. Ke studiu evoluce a fylogenetických vztahů potom používáme kladistické metody.

Ve své práci využiji především ordinační metody a diskriminační analýzy, případně i shlukovací analýzy. Diskriminační analýzy slouží hlavně k testování hypotéz a díky nim můžeme zkoumat rozdíly mezi skupinami objektů. Rozlišujeme kanonickou diskriminační analýzu, která má za úkol interpretovat rozdíly mezi již stanovenými skupinami objektů a dále klasifikační analýzu, jejímž cílem je odvození jedné nebo více rovnic za účelem identifikace objektů a jejich následnému rozdělení do skupin.

Shlukovací analýzy pracují se shluky neboli klastry. Jedná se o skupinu objektů, které uvnitř větší skupiny nemají ani nahodilý, ani rovnoměrný výskyt a vzdálenost (podobnost) mezi nimi je vždy menší než vzdálenost mezi objekty, patřící do jiných shluků. Metody lze rozdělit například podle způsobu tvorby shluků, jejich překryvu či uspořádání. Vždy je ale nutno začít výpočtem vzdálenosti jednotlivých objektů (OTU), výstupem je pak dendrogram.

Ordinační metody redukují velký počet znaků na 2 až 3 nové, přičemž zachovávají co nejvíce informací z původních znaků. Hojně používanou metodou je analýza hlavních

komponent (PCA). Při té nahrazujeme původní soubor znaků souborem nových, vzájemně nekorelovaných znaků, přičemž první osa (komponenta) je vedena ve směru největší variability mezi objekty, každá další osa je pak kolmá na ty předešlé. Pokud pracujeme s binárními či vícestavovými kvalitativními znaky, potom je vhodnější metodou analýza hlavních koordinát (PcoA). Ta vytváří konfiguraci OTU tak, aby co nejlépe odrážela vztahy mezi objekty v původní matici vzdáleností (Marhold and Suda 2002).

5.2.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM – Flow cytometry) je laboratorní metoda využívaná k měření chemických a fyzikálních vlastností různých izolovaných částic, nejčastěji celých buněk nebo jejich částí (Shapiro 2003). V medicíně se používá například ke studiu krevních buněk, v botanice pak díky ní můžeme stanovit množství obsahu jaderné DNA, studovat genovou expresi, analyzovat buněčný cyklus či určit ploidii (Suda 2005).

Principem cytometrie je zkoumání optických vlastností částic, nejčastěji pak intenzity fluorescence. Na připravený materiál se nejprve naváže specifické fluorescenční barvivo, které pak přístroj ozařuje světlem vhodné vlnové délky, což vede k jeho excitaci. Při návratu elektronů do původního stavu dojde k uvolnění energie a optická soustava cytometru zachytí fluorescenci, který je následně převedena na pulsy elektrického proudu. Výstupem analýz je histogram, případně mohou být výsledky ve formě 2D grafu. Při měření materiálů je nutné používat standardy, u kterých je nám známa velikost genomu. Poté můžeme porovnat poměr intenzity fluorescence obou objektů (Suda 2011).

Metoda průtokové cytometrie má mnoho výhod. Je nedestruktivní, vzorky lze připravit velmi snadno a rychle, taktéž analýzy mají vysokou rychlost. Také můžeme měřit mnoho typů pletiv, přičemž jako nejvhodnější se jeví mladé listy kvůli nízké hladině sekundárních metabolitů. Cytometrické analýzy vyžadují pouze nízké finanční náklady, ovšem pořizovací cena přístroje je poměrně vysoká. Další nevýhodou je nutnost zpracovávat čerstvý materiál, tedy provádět analýzy co nejdříve po odběru vzorků (Suda 2005, 2011).

Pokud používáme cytometrii ke studiu polyploidních taxonů, je vhodné mít u zástupce každého cytotypu spočítané chromozomy. Chromozomové počty u okruhu *G. palustre* zjišťovalo několik autorů, viz tabulka č. 1. V rámci svého výzkumu také provedu počítání chromozomů u obou (všech) zjištěných cytotypů.

5.2.3. Molekulární metody

Existuje mnoho moderních molekulárních metod, které by pomohly objasnit danou problematiku. Jejich použití je zatím nejisté, ovšem mohly by být využity v budoucím studiu, proto je zde nastíním. Každá metoda má své výhody i nevýhody a bude třeba prozkoumat, která z nich by byla nejvhodnější pro studium okruhu *G. palustre*.

5.2.3.1. Sekvenace DNA

Nejvíce používaným přístupem v biosystematických studiích je analýza sekvencí DNA. Metoda je hojně využívána v molekulární fylogenetice a pomáhá objasnit způsob vzniku taxonů. Sekvenováním DNA získáme informaci o přesném pořadí nukleotidů v molekule. Poté můžeme porovnávat rozdíly v sekvencích stejných lokusů u jedinců různých taxonů, tedy určit DNA polymorfismus. Pokud se na stejném místě vyskytuje rozdílný nukleotid, jedná se o bodové mutace. Pokud se dvě sekvence liší délkou, došlo zde buď k inserci nebo delecii nukleotidů a jedná se tedy o délkový polymorfismus.

Nejpoužívanější metodou sekvenace je Sangerova metoda, při níž je potřeba částečná znalost sekvence studovaného úseku. Fragment je namnožen pomocí primeru a polymerázy, a kromě deoxyribonukleotidů (dNTP) jsou ještě třeba fluorescenčně označené dideoxyribonukleotidy (ddNTP). Na základě komplementarity se molekuly začlení do nově vzniklého řetězce DNA. Po začlenění molekuly ddNTP, která neobsahuje volnou -OH skupinu na svém 3' konci, syntéza řetězce končí a vzniknou tak různě dlouhé úseky DNA, lišící se délkou vždy o 1 nukleotid. Následně se molekuly rozdělí elektroforeticky podle délky v kapiláře kapilárového sekvenátoru, který dokáže detekovat fluorescenční signál, typický pro každý ddNTP. Podle pořadí, ve kterém procházejí, lze následně určit pořadí nukleotidů v sekvenovaném úseku (Krač 2011). Modernější metodou sekvenování je takzvané sekvenování druhé generace (NGS), která umožňuje číst až statisíce úseků DNA současně (Štorchová 2011).

Rostlinná buňka obsahuje několik typů DNA. Kromě jaderné DNA, která je nositelem většiny genetických informací, zde najdeme i organelární DNA, která se vyskytuje v mitochondriích a chloroplastech. Každý druh DNA má jiná specifika a s tím spojené výhody či nevýhody pro studium. Chloroplastová DNA (cpDNA) je poměrně krátká kruhová molekula, jejíž struktura je dosti konzervativní, díky čemuž mohla vzniknout řada univerzálních primerů. Je haploidní, uniparetální a neprobíhají v ní rekombinace. Tyto aspekty jsou příčinou nepřítomnosti alelické variability v rámci stejného jedince. CpDNA je velmi často využívána

v biosystematických studiích, a to zejména pro studium fylogeneze na úrovni čeledi. Mitochondriální DNA (mtDNA) je také haploidní a má uniparentální dědičnost, ale její velikost u rostlin je velmi proměnlivá. Jedná se o nejpomaleji mutující typ DNA. Sekvence jejích genů i nekódujících intronů již pomohli objasnit mnoho fylogenetických vztahů. Jaderná ribosomální DNA (nrDNA) je děděna biparentálně. Základní jednotku tvoří 3 geny a jejich produkty jsou zodpovědné za vznik velké a malé ribosomální podjednotky. Díky množství konzervovaných úseků bylo možné navrhnout univerzální primery, používaných k amplifikaci úseků DNA. V jádře najdeme také jaderné geny s nízkým počtem kopií (low-copy nuclear genes), které na rozdíl od nrDNA dokáží podat nezkrácené informace o obou rodičovských liniích (Krač 2011).

5.2.3.2. Dominantní molekulární markery

Při této metodě je možné detekovat pouze celkový genotyp, nejsme schopni odlišit homozygoty od heterozygotů, a tedy určit frekvence alel. Výstupem metod je pattern proužků, u každého jedince potom určujeme lokusy na základě přítomnosti či nepřítomnosti proužku. Tato binární data je poté nutné zanalyzovat ve statistických programech. Mezi nejpoužívanější metody patří RAPD, ISSRs a AFLP, vzájemně se liší hlavně způsobem generování výsledných proužků. Všechny metody mají vysokou variabilitu a současně se analyzuje mnoho nezávislých lokusů, které jsou náhodně rozmístěny po celém genomu (Fér 2011).

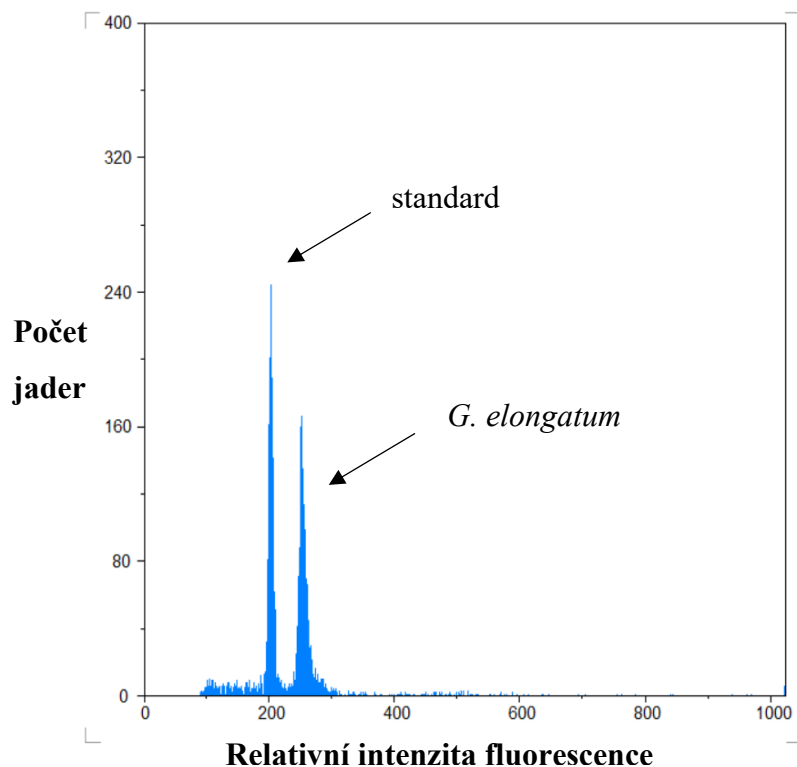
5.2.3.3. Mikrosatelity

Jako mikrosatelity se označují krátké úseky DNA, kde se tandemově opakují nukleotidové sekvence. Nejhojněji se vyskytují mononukleotidové repetice poly(A/T), kvůli jejich nízké stabilitě se ale nejvíce pracuje s motivy obsahující 2 až 4 báze (Li et al. 2002, Mandák 2011). Metody využívající mikrosatelity se stávají čím dál více oblíbenější díky množství výhod. Jedná se o kodominantní markery, které jsou vysoce polymorfní a jsou ve velkém počtu rozmístěny po celém genomu. Analýza je poměrně jednoduchá a levná, je ale nutné používat druhově specifické primery, jejichž výroba je velmi nákladná (Mandák 2011).

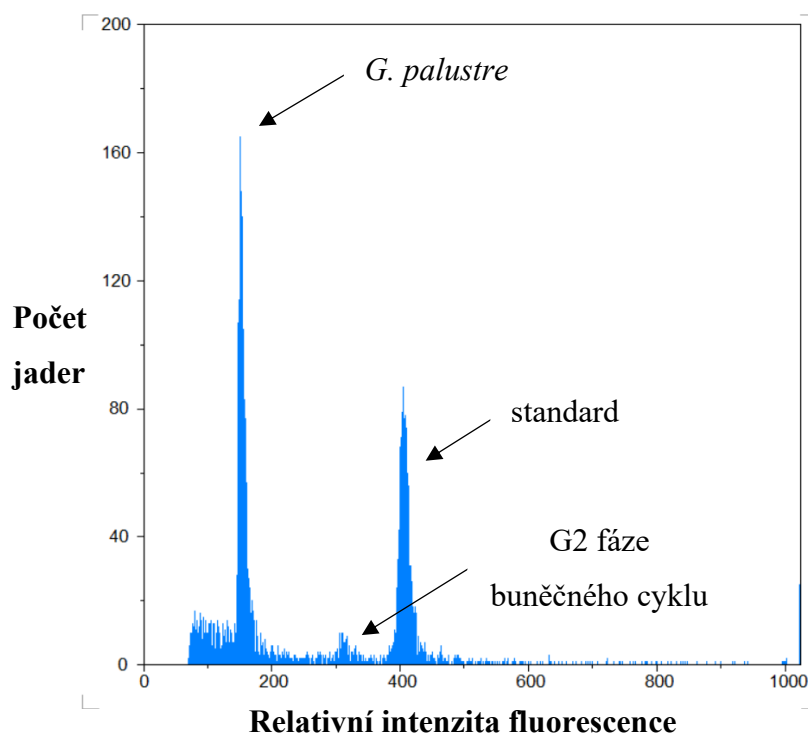
5.3. Výsledky předběžných analýz

V roce 2019 jsem v rámci příprav na budoucí diplomovou práci provedla pilotní testování na studované skupině svízelů. Pro cytometrickou analýzu bylo použito 28 jedinců z 18 populací, kteří byli nasbíráni především z lokalit okolo Prahy a z Třebońska. Jako standard byla použita *Bellis perennis* a vzorek byl obarven fluorescenčním barvivem propidium jodid (PI). Analýza prokázala přítomnost obou základních cytotypů ve studovaném materiálu, viz obrázek

č. 5 a 6. Zároveň se potvrdilo, že se tyto cytotypy od sebe výrazně liší obsahem DNA a průtokovou cytometrii lze pro plánovaný cíl diplomové práce použít, viz tabulka č. 3.



Obrázek č. 5. Histogram z průtokové cytometrie – oktoploidní *Galium elongatum*



Obrázek č. 6. Histogram z průtokové cytometrie – diploidní *Galium palustre*

druh	N	ploidie	2C (pg)
<i>G. palustre</i>	21	2x	1,23 (1,17–1,28)
<i>G. elongatum</i>	7	8x	4,17 (4,08–4,26)

Tabulka č. 3. Výsledky pilotních cytometrických analýz

Hodnota N vyjadřuje počet měřených jedinců; hodnota 2C je průměrem všech měření, kdy každý jedinec byl měřen 3x, v závorce je pak uvedeno celkové rozpětí naměřených hodnot.

6. Závěr

Bakalářská práce shrnuje doposud známé informace o rostlinách z okruhu *G. palustre*. Ty mají centrum rozšíření v Evropě, kde vyhledávají různá vlhká stanoviště. Taxonomie této skupiny je komplikovaná kvůli množství cytotypů, jejich nejasnému původu a velké morfologické variabilitě. Zahraniční cytologické, ekologické a morfologické studie prokázaly jisté odlišnosti mezi diploidním *G. palustre* a oktoploidním *G. elongatum*. Situaci ale komplikují tetraploidní rostliny, které mají ve většině znaků intermediární pozici a často se rozsahy hodnot kvantitativních znaků překrývají s hodnotami obou zbývajících cytotypů. Jako vhodné rozlišovací znaky jsou uváděny velikost koruny, plodů a průduchů a také tvar květenství. Naopak výška rostlin a velikost listů jsou proměnlivé v závislosti na podmínkách prostředí. Naproti tomu *G. debile* je dobře odlišeným druhem, který se liší jak v morfologii, tak v ekologii, avšak do střední Evropy nezasahuje (Hancock 1942, Kliphuis 1974, Teppner et al. 1976).

Z území České republiky existuje pouze omezené množství poznatků o této skupině a zatím nebyla provedena žádná systematická kvantitativní studie. Na tuto bakalářskou práci proto bude navazovat diplomová práce, kde bude využito řady moderních metod k objasnění cytologické, morfologické i ekologické variability.

7. Použitá literatura

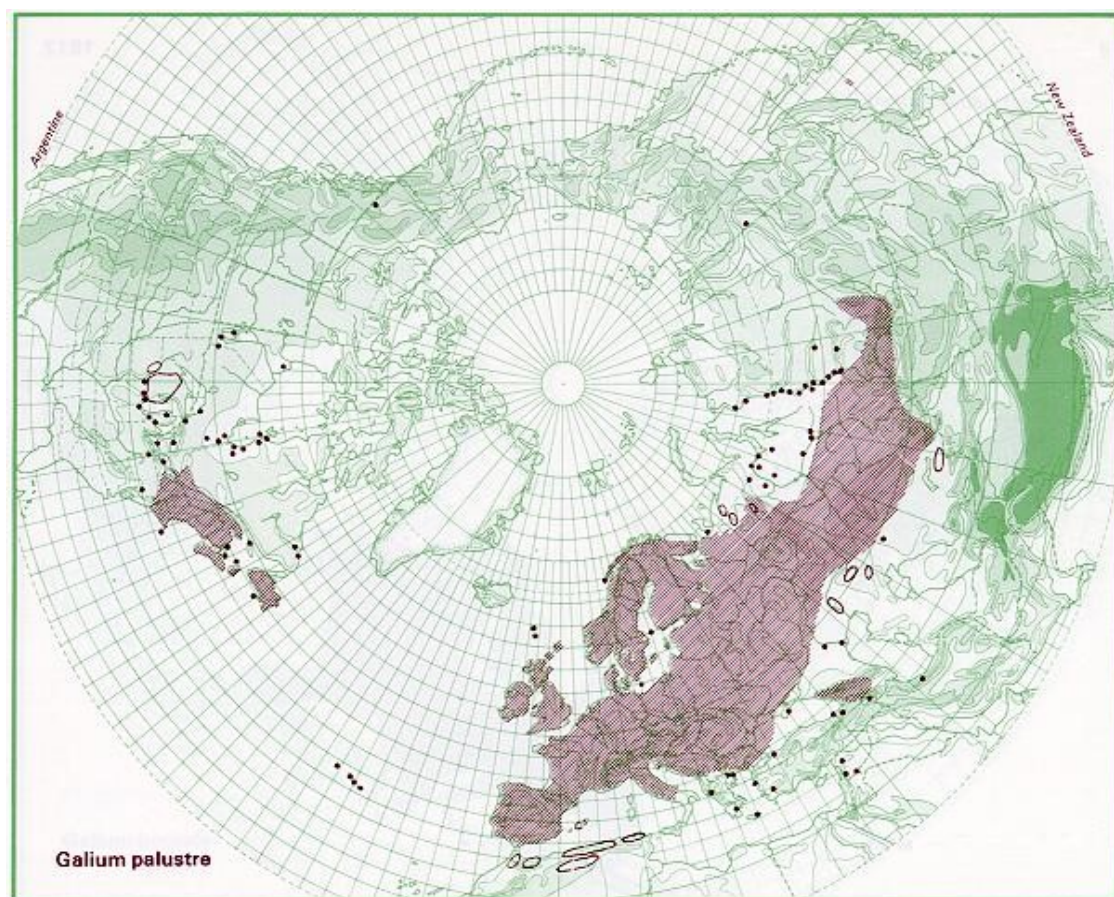
- Abbott, R et al. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 26, 229–246.
- Amborella Genome Project (2013). The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. *Science* 342, 1241089–1241089.
- Anderson, E (1953). Introgressive hybridization. *Biological Reviews* 28, 280–307.
- Apelgren, K (1991). Environmental response of *Galium palustre* s. lat. in a coastal area in Central Sweden. *Nordic Journal of Botany* 10, 593–606.
- Apelgren, K, and Lernstål, R (1991). Variation in *Galium palustre* s. lat. in the Baltic land-uplift area. *Nordic Journal of Botany* 10, 565–592.
- Barton, NH, and Hewitt, GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 16, 113–48.
- Björkman, O, and Holmgren, P (1963). Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. *Physiologia Plantarum* 16, 889–914.
- Bradshaw, AD (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: *Advances in Genetics* 13, eds. EW Caspari, and JM Thoday, Academic Press, 115–155.
- Briggs, D, and Walters, SM (2001). *Proměnlivost a evoluce rostlin*, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.
- Ehrendorfer, F, Krendl, F, and Puff, C (1976). *Galium* L. In: *Flora Europaea* 4, ed. TG Tutin et al., Cambridge: Cambridge University Press, 14–36.
- Ehrendorfer, F (1980). Polyploidy and distribution. In: *Polyploidy*, ed. WH Lewis, Boston, MA: Springer US, 45–60.
- Ehrendorfer, F, Barfuss, MHJ, Manen, J-F, and Schneeweiss, GM (2018). Phylogeny, character evolution and spatiotemporal diversification of the species-rich and world-wide distributed tribe *Rubieae* (*Rubiaceae*). *PLoS ONE* 13, e0207615.
- Fér, T (2011). Dominantní (binární) molekulární markery a jejich využití v populační a systematické biologii. In: *Evoluční aspekty biologie rostlin*, eds. B Mandák, F Krahulec, and Z Hroudová, Praha: Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25, 61–78.

- Flegr, J (2007). Úvod do evoluční biologie, Praha: Academia.
- Frajman, B, and Bačič, T (2011). Contributions to the knowledge of the flora of Slovenia and adjacent regions: taxonomic revision and distributional patterns of ten selected species. *Phyton (Horn)* 50, 231–262.
- Hancock, BL (1942). Cytological and ecological notes on some species of *Galium* L. *Em. Scop. New Phytologist* 41, 70–78.
- Hegarty, MJ, and Hiscock, SJ (2008). Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology* 18, 435–444.
- Hultén, E, and Fries, M (1986). Atlas of North European vascular plants north of the Tropic of Cancer, Königstein, Federal Republic of Germany: Koeltz scientific Books.
- Chen, T, and Ehrendorfer, F (2011). *Galium*. In: Flora of China 19, eds. Z-Y Wu, PH Raven and D-Y Hong, Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 104–141.
- Khandelwal, S (1990). Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* 102, 205–217.
- Kliphuis, E (1974). Cytotaxonomic studies in *Galium palustre* L. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Series C* 77, 408–425.
- Kliphuis, E (1983). Cytotaxonomic notes on some species of the genus *Galium* L. (*Rubiaceae*) collected in the north-western parts of Spain. *Lagascalia* 11, 229–244.
- Kliphuis, E (1986). Cytotaxonomic investigations on some species of the genus *Galium* (*Rubiaceae*) from the Balkans. *Nordic Journal of Botany* 6, 15–20.
- Kliphuis, E, Heringa J and Hogeweg P (1986). Cytotaxonomic studies on *Galium palustre* L. Morphological differentiation of diploids, tetraploids and octoploids. *Acta Botanica Neerlandica* 35, 383–392.
- Krak, K (2011). Využití sekvencí DNA při studiu rostlin. In: *Evoluční aspekty biologie rostlin*, eds. B Mandák, F Krahulec, and Z Hroudová, Praha: Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25, 95–125.

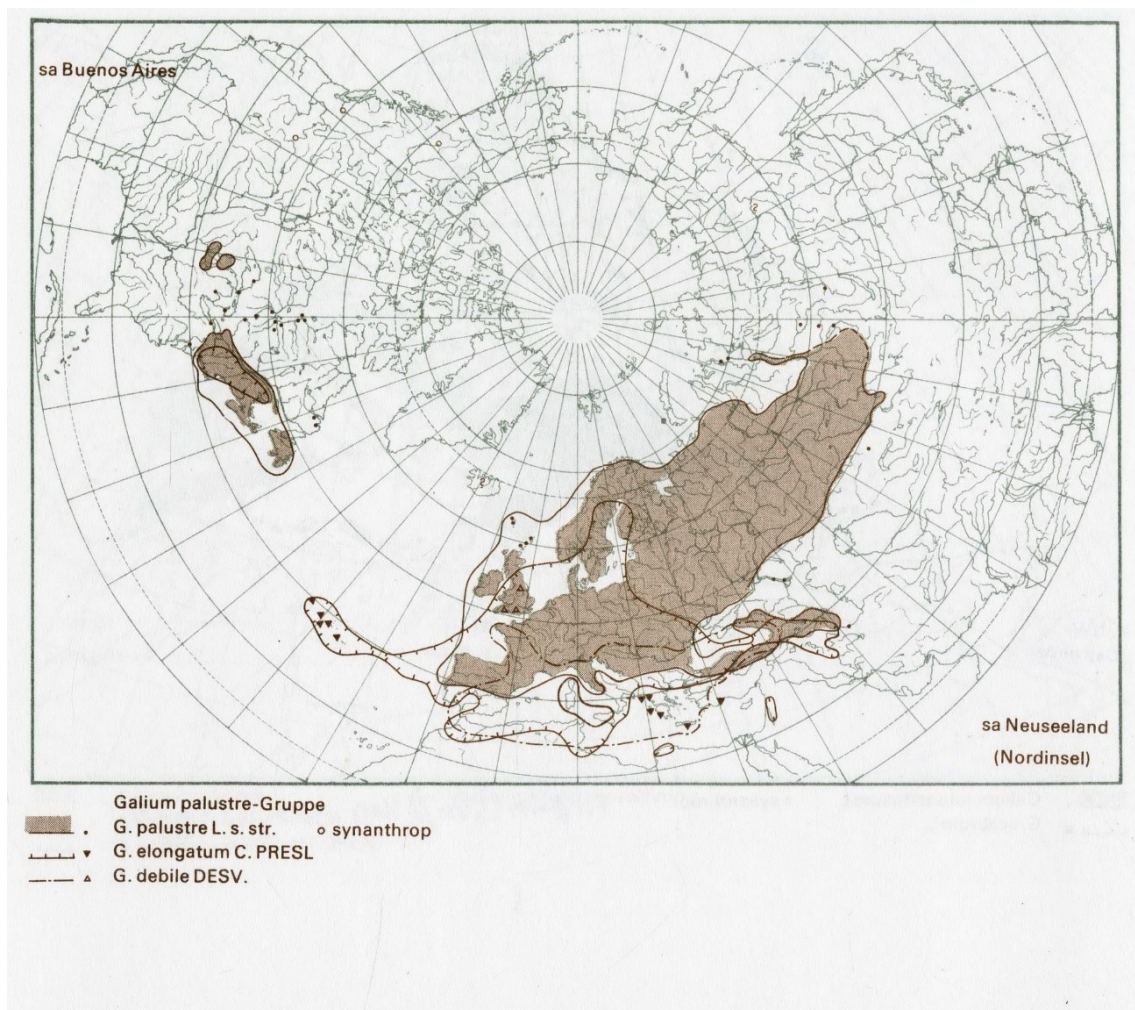
- Lewis, WH (1976). Temporal adaptation correlated with ploidy in *Claytonia virginica*. Systematic Botany 1, 340.
- Li, Y-C, Korol, AB, Fahima, T, Beiles, A, and Nevo, E (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11, 2453–2465.
- Mabberley, DJ (2008). Mabberley's Plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses, Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- Mandák, B (2011). Mikrosatelity – jejich funkce, význam a použití v současné biologii. In: Evoluční aspekty biologie rostlin, eds. B Mandák, F Krahulec, and Z Hroudová, Praha: Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25, 79–94.
- Marhold, K, and Suda, J (2002). Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii, Praha: Karolinum.
- Meusel, H, and Jäger, EJ (1992). Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora 3, V Gustav Fischer, Stuttgart; New York: Jena.
- Ortega Olivencia, A, and Devesa, JA (2007). *Galium* L. In: Flora Iberica 15, eds. JA Devesa, R Gonzalo, and A Herrero, Madrid: Real Jardín Botánico, 56–162.
- Otto, SP, and Whitton, J (2000). Polyploid incidence and evolution. Annual Review of Genetics 34, 401–437.
- Puff, C (1976). The *Galium trifidum* group (*Galium* sect. *Aparinoides*, *Rubiaceae*). Canadian Journal of Botany 54, 1911–1925.
- Puff, C (1977). The *Galium obtusum* group (*Galium* sect. *Aparinoides*, *Rubiaceae*). Bulletin of the Torrey Botanical Club 104, 202–208.
- Ridley, M (2004). Evolution, Oxford; New York: Oxford University Press.
- Rouy, G (1903). Flore de France 8, Paris: Asnières.
- Shapiro, H (2003). Practical flow cytometry, New York: Wiley-Liss.
- Soltis, DE, Albert, VA, Leebens-Mack, J, Bell, CD, Paterson, AH, Zheng, C, Sankoff, D, de Pamphilis, CW, Wall, PK, and Soltis, PS (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. American Journal of Botany 96, 336–348.

- Soltis, PS, and Soltis, DE (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 561–588.
- Štěpánková, J (2000). *Galium* L. – svízel. In: Květena České republiky 6, eds. B Slavík, J Chrtek jun., and J. Štěpánková, Praha: Academia, 122–156.
- Štorchová, H (2011). Využití sekvenování dalších generací (NGS). In: Evoluční aspekty biologie rostlin, eds. B Mandák, F Krahulec, and Z Hroudová, Praha: Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25, 127–139.
- Suda, J (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií? *Živa* 53/1, 46–48.
- Suda, J (2011). Průtoková cytometrie a její využití v botanice. In: Evoluční aspekty biologie rostlin, eds. B Mandák, F Krahulec, and Z Hroudová, Praha: Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25, 21–42.
- Teppner, H, Ehrendorfer, F, and Puff, C (1976). Karyosystematic notes on the *Galium palustre*-Group (*Rubiaceae*). *Taxon* 25, 95–97.
- Uhl, CH (1978). Chromosomes of Mexican *Sedum* II. Section *Pachysedum*. *Rhodora* 80, 491–512.
- Yang, L-E, Meng, Y, Peng, D-L, Nie, Z-L, and Sun, H (2018). Molecular phylogeny of *Galium* L. of the tribe *Rubieae* (*Rubiaceae*) – Emphasis on Chinese species and recognition of a new genus *Pseudogalium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 126, 221–232.

8. Přílohy



Příloha 1. Rozšíření *Galium palustre* (Převzato z Hultén and Fries 1986)



Příloha 2. Rozšíření zástupců *Galium palustre* agg. (Převzato z Meusel and Jäger 1992)